



„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

Metoda **TILLING** (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) to metoda odwrotnej genetyki oparta na wykorzystaniu enzymu CEL I (endonukleazy w izolowanej z selera naciowego *Apium graveolens*), który wykrywa indukowane (TILLING) lub naturalnie występujące (Eco-TILLING) polimorfizmy wśród analizowanych fragmentów DNA. Strategia ta, może być użyta do wykrywania zmienności praktycznie u każdego organizmu. Obecnie na świecie prowadzone są badania z wykorzystaniem tej metody między innymi u rzodkiewnika, jęczmienia, kukurydzy, komonicy oraz niektórych zwierząt takich jak *Drosophila melanogaster*, *Danio reiro* czy *Rattus norvegicus*. Przewagą tej strategii nad innymi metodami odwrotnej genetyki jest możliwość zastosowania u każdego organizmu, wysoka automatyzacja analiz, oraz niezależność metody od rozmiaru genomu czy systemu reprodukcji organizmu.

CEL:

Jak przygotować eksperyment przy użyciu techniki TILLING, a w szczególności:

- Izolacja DNA,
- Przygotowanie pul DNA,
- Formowanie heterodupleksów oraz CJE (Celery Juice Digestion),
- Przygotowanie żelu poliakrylamidowego, elektroforeza produktów cięcia oraz analiza wyników uzyskanych dzięki metodzie TILLING.

Materiał roślinny:

24 pule DNA (składające się z DNA 8 osobników) wyizolowanego z roślin pokolenia M₂ jęczmienia odmiany ‘Sebastian’.

Analizowany gen:

Gen *DRF1* (*Dehydration-Responsive Factor 1*) jest zaangażowany w odpowiedź roślin na stres suszy. Ulega on alternatywnemu splicingowi, w wyniku czego powstają trzy formy transkryptu. DRF1.1, DRF1.2 oraz DRF1.3. Tylko pierwsza i trzecia forma zawierają domenę AP2 (APETALA 2), charakterystyczną dla wielu czynników transkrypcyjnych. Czynniki transkrypcyjne oddziałują synergistycznie z *HvABI5* w obrębie regionu promotorowego genu *HVA1*.



„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

Startery używane do amplifikacji fragmentu w reakcji PCR:

Symbol	Sekwencja 5'-3'	T _m
DRF1.3 F	5'-IRD700-ATGGCCCTAATTCCGTCTCT-3'	60°C
DRF1.3 R	5'-IRD800-ACAGTCACCGGGTCAACTTC-3'	60°C

Część 1. Amplifikacja fragmentu *DRF1* w pulach DNA

Przygotuj mieszaninę reakcyjną w celu amplifikacji w reakcji PCR fragmentu DRF1.3 używając jako matrycy puli DNA pochodzącej z 8 roślin.

Mieszanina reakcyjna PCR dla 1 próbki (objętość mieszaniny 17 µl):

- | | |
|--|---------|
| • ddH ₂ O | 12.0 µl |
| • 10 x bufor dla polimerazy Taq (ColorTag) | 2.0 µl |
| • dNTPs (5 mM, Promega) | 1.0 µl |
| • starter forward (20 pmol/µl) znakowany IRD 700 | 0.5 µl |
| • starter reverse (20 pmol/µl) znakowany IRD 800 | 0.5 µl |
| • 20mg/ml BSA (Fermentas) | 0.5 µl |
| • polimeraza ColorTag (EURx 2 U/µl) | 0.5 µl |
| | <hr/> |
| | 17.0 µl |
- Przygotuj ‘master mix’ dla wszystkich próbek DNA (w 1.5 ml probówkach typu eppendorf), rozdziel po 17.0 µl przygotowanego mixu do 0.2 ml probówek PCR oraz dodaj do nich po 3.0 µl odpowiedniej puli DNA (100 ng/µl). **Pamiętaj by zwirować płytki z pulami DNA przed ich użyciem!**
 - Końcowa objętość mieszaniny wynosi 20 µl.
 - Wymieszaj i zwiruj wszystkie przygotowane próbki przed rozpoczęciem reakcji PCR.

Umieść próbki w termocyklerze oraz wybierz poniższy program, który został zoptymalizowany dla amplifikacji przy użyciu zastosowanej pary starterów:

1. wstępna denaturacja	94°C	5 min
2. denaturacja	94°C	45 sec
3. przyłączanie starterów	60°C	40 sec (32 cykle od kroku 2 do 4)
4. elongacja	72°C	45 sec
5. końcowe wydłużanie	72°C	5 min
6. pauza	4°C	



„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

Część 2. Potwierdzenie obecności specyficznego produktu PCR z wykorzystaniem elektroforezy agarozowej

Przygotowanie żelu agarozowego 1 %

Przygotuj mieszaninę 1% żelu agarozowego w roztworze 0,5 x TBE

Składniki żelu	Ilość
0,5 TBE	50 ml
agarozą	0,5 g

Podgrzej mieszaninę żelową przygotowaną w zlewce (250 ml) w kuchence mikrofalowej w celu całkowitego rozpuszczenia agarozy, aż do otrzymania klarownego roztworu. Ostudź podgrzany roztwór do temperatury pokojowej pod bieżącą wodą. Do ostudzonego roztworu dodaj 2,3 µl bromku etydyny. Zachowaj szczególną uwagę w trakcie dodawania bromku – substancja kancerogenna!!!

Do wcześniej przygotowanych saneczek ostrożnie wylej żel, by nie wywołać powstania pęcherzyków powietrza. Następnie włóż grzebień wyznaczający kieszonki w żelu.

Żel celu pozostaw do polimeryzacji na ok. 30-40 minut.

Elektroforeza agarozowa

Przełóż saneczki ze spolimeryzowanym żelem agarozowym do naczynka elektroforetycznego zawierającego roztwór 0,5xTBE. Wyjmij grzebień. Nałóż 5 µl produktów PCR do kieszonek żelu. Do ostatniej kieszonki nałóż 3 µl markera wielkości. Podłącz elektrody do wzmacniacza i ustaw warunki elektroforezy: napięcie 90V, czas 45 min.

Analiza

Umieść żel w komorze UV. Uruchom aplikację BioCapt i po włączeniu lampy UV obserwuj obecność lub brak produktu o wielkości 705 pz w oparciu o marker wielkości. Oszacuj ilość produktu reakcji PCR.



„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

Część 3. Formowanie homo- i heteroduplexów, cięcie przy użyciu CJE, oczyszczanie i koncentracja produktów cięcia

Tworzenie homo- i heteroduplexów

W celu formowania homo- i heteroduplexów umieść amplikony uzyskane w poprzednim kroku w termocyklerze oraz zastosuj następujący program (heterod-iaea):

1. temp. 95°C 3 min
2. temp. 70°C 20 sec – x 70 cykl (- 0.1/cykl)
3. temp. 8°C

Cięcie heteroduplexów CJE – Celery Juice Extract (0.1xCJE)

- Przepipetuj 10 µl każdej z próbek do płytki PCR.
- Przygotuj odpowiednią objętość 0.1 x CJE ze stoku (1x CJE) poprzez 10x rozcieńczenie ekstraktu. Do każdej próbki dodaj 20 µl 0.1x CJE.
- Zamknij szczelnie płytkę PCR przy pomocy folii. Wymieszaj przygotowane próbki używając worteksu oraz zwiruj płytkę.
- Umieść płytkę PCR w termocyklerze na 15 minut w temp. 45°C.
- Po inkubacji próbek dodaj do każdej z nich 5.0 µl of 0,225 M EDTA, pH 8.0 w celu przerwania reakcji cięcia CJE.

Oczyszczanie i koncentracja produktów cięcia

- Dodaj do każdej próbki 60 µl 96% etanolu z 1% octanem sodu.
- Zamknij płytkę przy pomocy folii PCR.
- Energicznie zworteksuj a następnie zwiruj (temp. 4°C, 4000 rpm, 15-20 min.).
- Wyjmij płytkę z wirówki, zdejmij folię PCR. Płytkę nakryj ręcznikiem papierowym i odwróć ją do góry dnem na kilka sekund aby pozbyć się etanolu. Wyrzuć mokry ręcznik papierowy.
- Dodaj 30 µl 70% etanolu.
- Zaklej płytkę folią PCR.
- Energicznie zworteksuj, a następnie zwiruj (temp. 4°C, 4000 rpm, 15 min.).



„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

- Wyjmij płytkę z wirówki, zdejmij folię PCR. Płytkę nakryj ręcznikiem papierowym i obróć ją do góry dnem na kilka sekund aby pozbyć się etanolu. Wyrzuć mokry ręcznik papierowy.
- Umieść płytkę w termocyklerze i inkubuj w tem. 80°C przez 10-15 minut, tak, by wyparował pozostały etanol.
- Dodaj 2 - 4 µl of buforu stop (w zależności od ilości produktów PCR oszacowanej na podstawie elektroforezy w żelu agarozowym).
- Przechowuj -20°C .

Część 4. Przygotowanie żelu poliakrylamidowego

Wylewanie żelu (automatyczny sekwenator Li-Cor)

- Przemyj obie szyby używając wody dejonizowanej oraz dokładnie wytrzyj czystym ręcznikiem papierowym, uważając żeby nie pozostawić na powierzchni szyby żadnych fragmentów papieru.
- Połóż obie szyby na płasko na stole laboratoryjnym.
- Ułóż odstępniki na bocznych krawędziach dłuższej z szyb. Krótszą szybę połóż na wierzch.
- Upewnij się, że przestrzeń pomiędzy szybami jest idealnie czysta.
- Załóż czyste szyny składając obie szyby razem, dokręć śruby, używając odpowiedniej siły, wystarczającej by utrzymać razem szyby.

Przygotuj 6% mieszaninę żelu poliakrylamidowego w buforze 1 x TBE (20 ml) według przepisu:

Składniki żelu	Ilość
mocznik	8.4 g
Bufor 10 x TBE	2 ml
30% AA (acrylamide/bisacrylamide)	4 ml
NEUROTOKSYNA !!!	
ddH ₂ O	do 20 ml

Umieść wszystkie składniki w zlewce (100 ml) a następnie mieszając rozpuść, ogrzewając zlewkę pod ciepłą bieżącą wodą.

TEMED	15 µl
10% APS	150 µl

Dodaj TEMED i 10% APS do mieszaniny żelowej, zamieszaj ostrożnie i natychmiast rozpocznij wylewanie żelu.



„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

Wylewanie żelu

- Wylewaj żel nieprzerwanie od górnej części szyb, dbając, by nie powstawały pęcherzyki powietrza. Czynność wykonaj w miarę szybko, tak by nie dopuścić do rozpoczęcia polimeryzacji poliakrylamidu.
- Wsuń grzebień formujący kieszonki żelu płaską powierzchnią między szyby (tak, by zęby grzebienia znajdowały się na zewnątrz). Umieść płytkę przytrzymującą grzebień i dokręć śruby w szynach. Pozostaw całość w pozycji horyzontalnej na 1 godzinę celu polimeryzacji żelu.

Pre-Electroforeza

- Gdy żel całkowicie spolimeryzuje, usuń płytkę przytrzymującą grzebień oraz sam grzebień spomiędzy szyb. Następnie oczyść bardzo uważnie szyby z fragmentów poliakrylamidu. Przemyj grzebień wodą dejonizowaną i umieść go ponownie między szybami, tym razem zębami do środka, tak, by dotknął on czoła żelu.
- Umieść dolny pojemnik z buforem w sekwenatorze, następnie włóż przygotowany żel, tak by krótsza szyba znajdowała się na zewnątrz. Zainstaluj w aparaturze górny pojemnik z buforem w miejscu, gdzie wcześniej znajdowała się płytka przytrzymująca grzebień.
- Napełnij górny pojemnik buforem 1 x TBE do zaznaczonego poziomu maksimum (~ 500 ml), oraz wlej bufor do elektroforezy do dolnego pojemnika tak, by był on niemal pełny (~500 ml).
- Umieść górne i dolne elektrody w pojemnikach na bufor, połącz je ze źródłem zasilania oraz wystartuj pre-elektroforezę (1300 V, 30 W, 30 mA, z odczytem lasera w obu kanałach (700 and 800), 15 min.).

Część 5. Przygotowanie próbek i elektroforeza

- Zdenaturuj próbki w 95°C przez 3 min i natychmiast umieść na lodzie.
- Po zakończonej pre-elektroforezie, odłącz kabel zasilania oraz górną elektrodę. Przemyj kieszonki utworzone przez grzebień używając buforu do elektroforezy.
- Załaduj po 1µl próbki do kieszonek, pomiędzy szyby.
- Nałóż 0.5 µl markera wielkości do ostatniej studzienki.



„Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia - ATRINBIOTECH”
Priorytet IV POKL „Szkolnictwo wyższe i nauka”

Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Bankowa 12, 40-007 Katowice, <http://www.us.edu.pl>

- Umieść ponownie elektrodę oraz kabel zasilający na swoich miejscach i rozpocznij zasadniczą elektroforezę (1300 V, 30 W, 30 mA, 4-5 godzin, przy średniej prędkości skanowania lasera w obu kanałach).

Część 6. Analiza wyników

Określ długość produktu PCR i porównaj go z przewidywaną długością amplifikowanego fragmentu genu *DRF1*.

Odnajdź ścieżkę (ścieżki), w której (których) widoczne są fragmenty krótszej długości. Jeśli prążki w obu kanałach (jeden w kanale 700 a drugi w kanale 800) są obecne i suma ich długości jest równa długości pełnego produktu PCR, możesz przypuszczać, że badana pula zawiera roślinę niosącą mutację punktową w analizowanym fragmencie DNA.